

097142613

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP97/00804

13.03.97

REC'D 20 MAY 1997

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1996年 3月13日

出 願 番 号

Application Number:

平成 8年特許願第056090号

出 願 人

Applicant (s):

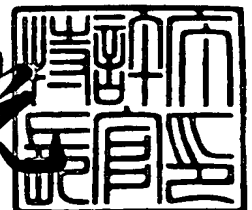
三菱化学株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1997年 5月 2日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平09-3032304

【書類名】 特許願

【整理番号】 960171

【提出日】 平成 8年 3月13日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/50

【発明の名称】 アルツハイマー病の診断方法

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県町田市南大谷 1 1 株式会社三菱化学生命科学
研究所内

【氏名】 石黒 幸一

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県町田市南大谷 1 1 株式会社三菱化学生命科学
研究所内

【氏名】 佐藤 一紀

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県町田市南大谷 1 1 株式会社三菱化学生命科学
研究所内

【氏名】 朴 正美

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県町田市南大谷 1 1 株式会社三菱化学生命科学
研究所内

【氏名】 内田 庸子

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県町田市南大谷 1 1 株式会社三菱化学生命科学
研究所内

【氏名】 今堀 和友

【特許出願人】

【識別番号】 000005968

特平 8-056090

【氏名又は名称】 三菱化学株式会社

【代表者】 三浦 昭

【代理人】

【識別番号】 100103997

【弁理士】

【氏名又は名称】 長谷川 暁司

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 035035

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9306391

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アルツハイマー病の診断方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ペアード・ヘリカル・フィラメント (Paired Helical Filament) 中のリン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位を含む部分ペプチドを免疫して得られる抗体を用いることを特徴とするアルツハイマー病の診断方法。

【請求項2】 リン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位が、配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列中の198番目のセリン、199番目のセリン、202番目のセリン、205番目のスレオニン、231番目のスレオニン、235番目のセリン、262番目のセリン、396番目のセリン、403番目のスレオニン、404番目のセリン、409番目のセリン、412番目のセリン、413番目のセリン及び422番目のセリンから選ばれる1以上のアミノ酸であることを特徴とする請求項1記載の診断方法。

【請求項3】 リン酸化タウ蛋白質のリン酸化部分が、配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列中の199番目のセリン、202番目のセリン、205番目のスレオニン、231番目のスレオニン、235番目のセリン、262番目のセリン、396番目のセリン、404番目のセリン、412番目のセリン、413番目のセリン及び422番目のセリンから選ばれる1以上のアミノ酸であることを特徴とする請求項1記載の診断方法。

【請求項4】 リン酸化部位を含む部分ペプチドがそのリン酸化部位の前後3から5アミノ酸残基からなるペプチドであることを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載の診断方法。

【請求項5】 リン酸化部位を含む部分ペプチドが配列表の配列番号2から16のいずれかに記載のアミノ酸配列で表されることを特徴とする請求項1から4のいずれかに記載の診断方法。

【請求項6】 ペアード・ヘリカル・フィラメント (Paired Helical Filament) 中のリン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位を含む部分ペプチドを免疫して得られる抗体を用いてアルツハイマー病を診断するための試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はアルツハイマー病の診断方法に存する。詳細には、ペアード・ヘリカル・フィラメント (Paired Helical Filament) 中のリン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位を含む部分ペプチドに対する抗体を用いたアルツハイマー病の診断方法に存する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

アルツハイマー病は初老期 (45～65才) に発病する進行性の痴呆で、病的な変化として神経細胞の変質および神経細胞数の減少による大脳皮質の萎縮が認められ、また、病理学的には、その脳内に多数の老人斑と神経原線維変化が認められる。65才以上の老年期に発症するいわゆる自然老化による老年痴呆も、病理学的に何ら本質的な差は認められないため、アルツハイマー型老年痴呆と呼ばれている。

【0003】

この疾患の患者数は、高齢者人口の増加とともに増大し、社会的に重要な疾患となっている。しかし、この疾患の原因については諸説あるものの結果的には未だ不明であり、早期の解明が望まれている。

アルツハイマー病の病理変化のひとつである老人斑の主要成分が、アミロイドβ蛋白質であることが解明されている (Annu. Rev. Neurosci., 12, 463-490(1989))。また、もうひとつの病理変化である神経原線維変化は、神経細胞内にPHF (ペアード・ヘリカル・フィラメント: Paired helical filament) が蓄積してくるものであり、その構成成分のひとつとしてタウ蛋白質が同定されている (J. Biochem., 99, 1807-1810(1986); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4913-4917(1986))。

【0004】

タウ蛋白質は、通常SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量48～65 kDに数本のバンドを形成する一群の近縁蛋白質であり、微小管の形成を促進することが知られている。

アルツハイマー病脳のPHF中に組み込まれたタウ蛋白質は、通常脳中のタウ蛋白質よりも異常にリン酸化されていることが、PHFに対するポリクローナル抗体（抗ptau; J. Biochem., 99, 1807-1810）や、タウ蛋白質に対するモノクローナル抗体（tau-1抗体; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4913-4917(1986)）を用いて証明されている。また、PHF中に組み込まれたリン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位も決定されるなど（特願平7-177241）、アルツハイマー病におけるタウ蛋白質の機構が判明しつつある。

【0005】

しかし、PHF中のリン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位に着目してアルツハイマー病の診断を行うことについては現在までに知られておらず、また、種々の抗体を使用したアルツハイマー病の診断方法が提案されてはいるが、臨床上有効な新たな診断方法が求められているのが現状であった。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、PHF中のリン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位に着目し、該リン酸化部位を含む部分ペプチドを免疫して得られる抗体がアルツハイマー病の診断に有用であることを見出し本発明を完成するに至った。

即ち本発明は、ペアード・ヘリカル・フィラメント（Paired Helical Filament）中のリン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位を含む部分ペプチドを免疫して得られる抗体を用いるアルツハイマー病の診断方法を提供するものである。

【0007】

上記発明の好ましい態様によれば、リン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位が、配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列中の198番目のセリン、199番目のセリン、202番目のセリン、205番目のスレオニン、231番目のスレオニン、235番目のセリン、262番目のセリン、396番目のセリン、403番目のスレオニン、404番目のセリン、409番目のセリン、412番目のセリン、413番目のセリンおよび422番目のセリンから選ばれる1以上のアミノ酸である上記方法；リン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位が、配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列中の199番目のセリン、202番目のセリン、20

5番目のスレオニン、231番目のスレオニン、235番目のセリン、262番目のセリン、396番目のセリン、404番目のセリン、412番目のセリン、413番目のセリンおよび422番目のセリンから選ばれる1以上のアミノ酸である上記方法；リン酸化部位を含む部分ペプチドがそのリン酸化部位の前後3から5アミノ酸残基からなるペプチドである上記方法；リン酸化部位を含む部分ペプチドが配列表の配列番号2から16のいずれかに記載のアミノ酸配列で表される上記方法が提供される。

【0008】

また、本発明の別の態様によれば、リン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位を含む部分ペプチドを免疫して得られる抗体を用いてアルツハイマー病を診断するための試薬キットが提供される。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明を以下に詳細に説明する。

本発明においてタウ蛋白質の具体例としては、Goedert et. alのNeuron, 3, 519-526(1989)に記載の352アミノ酸残基～441アミノ酸残基の一次構造を有するタウ蛋白質等が挙げられる。例えば、一次構造が配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列で表されるタウ蛋白質を使用した場合、同配列の198番目のセリン、199番目のセリン、202番目のセリン、205番目のスレオニン、231番目のスレオニン、235番目のセリン、262番目のセリン、396番目のセリン、403番目のスレオニン、404番目のセリン、409番目のセリン、412番目のセリン、413番目のセリンおよび422番目のセリンから選ばれる1以上のアミノ酸がリン酸化される(J. Biol. Chem., 270, 823-829(1995)およびNeurosci. Lett., 189, 167-170(1995))。

【0010】

本発明においては、上記配列の199番目のセリン、202番目のセリン、205番目のスレオニン、231番目のスレオニン、235番目のセリン、262番目のセリン、396番目のセリン、404番目のセリン、412番目のセリン、413番目のセリンおよび422番目のセリンから選ばれる1以上のアミノ酸

がリン酸化されたタウ蛋白質の部分ペプチドを使用することが好ましい。

【0011】

本発明で好ましく用いられるタウ蛋白質の部分ペプチドとしては、上記リン酸化部位の前後3から5アミノ酸残基からなるペプチドが好ましく、配列表の配列番号2から16のいずれかに記載のアミノ酸配列で表されるものが好ましい。

上記のペプチド中、配列番号3、13、15及び16で表される部分ペプチドはTetrahedron Lett., 32, 7083-7086 (1991)に記載されているように、リン酸化部位に対する保護基としてフェニル基を使用した固相法によるペプチド合成法により合成される。

【0012】

上記以外の配列番号で表されるリン酸化ペプチドのように、芳香族アミノ酸、含硫アミノ酸及び複素環式アミノ酸を有する場合には、Peptide Chemistry 1993, 109-112(1994)に記載されているように、リン酸化部位に対する保護基としてシクロヘキシル基を使用したペプチド固相法、あるいはChem. Lett., 1099-1112 (1994)に記載されているように、リン酸化部位に対する保護基としてベンジル基を使用したペプチド固相法により合成される。

【0013】

上記のようにして合成された部分ペプチドをキーホール・リンペットのヘモシアニン等の担体蛋白質に結合した後、ウサギに免疫し、得られた抗血清をペプチドカラムにより精製して特異性を調べることにより、上記で示したリン酸化部位を特異的に認識する抗体が得られる。また、本発明においては得られた抗血清を精製することなくそのまま用いることもできる。

【0014】

このようにして得られた抗体とアルツハイマー病の疑いのある個体から得られた試料とを、それ自体既知の通常用いられる方法により免疫反応させ、抗原-抗体反応物を検出して試料と抗体との反応性を調べることによりアルツハイマー病を診断できる。また、得られた抗体を用いて、それ自体既知の通常用いられる方法により、上記免疫反応及び検出工程等を行い得る、アルツハイマー病を診断するための試薬キットを調製できる。

【0015】

即ち、本発明においては、例えば次の通りアルツハイマー病を診断できる。

先ず、アルツハイマー病の疑いのある個体から組織、脳脊髄液または血液の試料を入手し、次いで上記のようにして得られた抗体と反応させる。組織の試料としては大脳皮質等が挙げられる。組織の試料を本願発明に従って診断する場合、組織が約0.1mg程度必要である。また脳脊髄液や血液を試料として用いる場合、約0.01ml程度が必要である。

【0016】

上記のような試料が得られたあと、その試料を生理的緩衝液中でホモジナイズし、遠心分離し、次いで得られた上清はまず分画して潜在している免疫グロブリンを除去したのち、上記で得られた抗体に対する反応性を指標として試験を行う。

上記で得られた画分を電気泳動にかけ上記で得られた抗体を加えて免疫ブロットを行う。このとき抗体には通常使用されるような標識を付けることにより検出してもよく、この抗体と免疫反応性のある二次抗体と反応させることにより検出してもよい。

【0017】

このようにして抗体との反応性を調べ、アルツハイマー病でない個体のコントロールと比較して反応性が増大している場合は、アルツハイマー病の疑いのある個体はアルツハイマー病であると、また、アルツハイマー病である個体のコントロールと比較して反応性が低下している場合はアルツハイマー病の疑いのある個体はアルツハイマー病でないと、確認することにより、アルツハイマー病の診断を行うことができる。

【0018】

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はその要旨を越えない限りこれらに限定されるものではない。

製造例1 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する部分ペプチド（以下、本ペプチドを「PS202」、本ペプチドに対する抗体を「anti-PS202」と称

することもある)の調製

H-Lys-Ser-Ser-Pro-Gly-Ser(H_2PO_3)-Pro-Gly-Thr-Pro-Gly-Ser-Arg-NH₂で表されるペプチドを次に述べる方法により製造した。なお、以下の説明で用いる記号は各々次のものを示す。MBHA樹脂：p-メチルベンツヒドリルアミン樹脂；Boc：t-ブチルオキシカルボニル基；Bzl：ベンジル基；Ph：フェニル基；Tos：p-トルエンスルホニル基；Z(2-Cl)：2-クロルベンジルオキシカルボニル基。

【0019】

(イ) H-Lys[Z(2-Cl)]-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Pro-Gly-Ser[PO(OPh)₂]-Pro-Gly-Thr(Bzl)-Pro-Gly-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-MBHA樹脂の製造

MBHA樹脂0.94 g (アミン含量0.64 mmol/g 樹脂)をバイオサーチ社製9500型自動ペプチド合成機にセットし、これにBoc-Arg(Tos)-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Ser[PO(OPh)₂]-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Lys[Z(2-Cl)]-OHを供給して、ジイソプロピルカルボジイミドを縮合剤として順次縮合させて上記の側鎖保護ペプチド-MBHA樹脂2.38 gを得た。

【0020】

(ロ) フッ化水素処理

上記(イ)で得た側鎖保護ペプチド-MBHA樹脂中の1.34 gを採取し、これを蛋白質研究奨励会ペプチド研究所製のフッ化水素反応装置にセットし、1.5 mlのアニソールの存在下で13 mlのフッ化水素と氷冷下1時間反応させた。反応終了後、フッ化水素を減圧下留去し、残留物を酢酸エチルで洗浄した後、2 M酢酸150 mlで抽出処理してH-Lys-Ser-Ser-Pro-Gly-Ser[PO(OPh)₂]-Pro-Gly-Thr-Pro-Gly-Ser-Arg-NH₂で表されるリン酸基を保護した粗ペプチド350 mgを得た。

【0021】

これを30%酢酸20 mlに溶解してセファデックスG-25のカラム(内径5 cm、長さ109 cm)にかけ、同じ溶媒を用いて溶出して目的物を含む画分を集めた。次いでこれを少量の蒸留水に溶解しODS(オクタデシルシラン)を

シリカに結合した逆相系のカラム（内径2 cm、長さ25 cm）を用いたHPLC（高速液体クロマトグラフィー）により精製した。溶出は0.1%トリフルオロ酢酸中、5から65%のアセトニトリルの直線濃度勾配により行った。精製物の収量は110 mgであった。本物質の構造はFAB質量分析により確認された。測定値 $[M+H]^+$; 1445、計算値 $(C_{61}H_{92}N_{18}O_{21}P_1+H)$; 1445。

【0022】

（ハ）加水素分解

上記（ロ）で得たリン酸基を保護したペプチド90 mg及び酸化白金80 mg（触媒）を1 mlの酢酸と混合して5～6気圧の水素圧下、室温で12時間攪拌した後、触媒を濾過した。濾液及び洗液を集めて凍結乾燥し、分取HPLCにより精製して最終目的物であるH-Lys-Ser-Ser-Pro-Gly-Ser(H_2PO_3)-Pro-Gly-Thr-Pro-Gly-Ser-Arg-NH₂で表されるリン酸化ペプチド55 mgを得た。本物質の構造はFAB質量分析により確認された。測定値 $[M+H]^+$; 1294、計算値 $(C_{49}H_{85}N_{18}O_{21}P_1+H)$; 1294。

【0023】

製造例2～4

配列表の配列番号13、15及び16に記載のアミノ酸配列を有する部分ペプチドについても上記製造例1と同様にして得た（以下、これらのペプチドをそれぞれ「PS413」、「PS412」、「PS412,413」、これらのペプチドに対する抗体をそれぞれ「anti-PS413」、「anti-PS412」、「anti-PS412,413」と称することもある）。

【0024】

製造例5 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する部分ペプチド（以下、本ペプチドを「PS199」、本ペプチドに対する抗体を「anti-PS199」と称することもある）の調製

H-Lys-Ser-Gly-Tyr-Ser-Ser(H_2PO_3)-Pro-Gly-Ser-Pro-Gly-Thr-NH₂で表されるペプチドを次に述べる方法により製造した。なお、以下の説明で用いる記号は各々次のものを示す。MBHA樹脂：p-メチルベンツヒドリルアミン樹脂；Boc：t-

ブチルオキシカルボニル基；Bzl：ベンジル基；cHex：シクロヘキシル基；Z(2-Br)：2-ブロモベンジルオキシカルボニル基；Z(2-Cl)：2-クロルベンジルオキシカルボニル基。

【0025】

(イ) H-Lys [Z(2-Cl)]-Ser(Bzl)-Gly-Tyr [Z(2-Br)]-Ser(Bzl)-Ser [PO(OcHex)₂]-Pro-Gly-Ser(Bzl)-Pro-Gly-Thr(Bzl)-MBHA樹脂の製造

MBHA樹脂 131 mg (アミン含量 0.76 mmol/g 樹脂) をバイオサーチ社製 9500 型自動ペプチド合成機にセットし、これに Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Ser [PO(OcHex)₂]-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Tyr [Z(2-Br)]-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Lys [Z(2-Cl)]-OH を供給し、ジイソプロピルカルボジイミドを縮合剤として順次縮合させて上記の側鎖保護ペプチド-MBHA樹脂 307 mg を得た。

【0026】

(ロ) トリフルオロメタンスルホン酸処理

上記 (イ) で得た側鎖保護ペプチド-MBHA樹脂中の 150 mg を採取し、これに 1 M 濃度のメタンスルホン酸とチオアニソールを含むトリフルオロ酢酸 10 ml と m-クレゾール 0.05 ml を加え、氷冷下 4 時間反応させた。反応終了後、氷冷したジエチルエーテル 200 ml を加えてペプチドを沈殿させた。全内容物をガラスフィルターで濾取し、冷ジエチルエーテルで洗浄した後 2 M 酢酸 200 ml で抽出処理して H-Lys-Ser-Gly-Tyr-Ser-Ser(H₂PO₃)-Pro-Gly-Ser-Pro-Gly-Thr-NH₂ で表される粗ペプチド 53 mg を得た。

【0027】

(ハ) ペプチドの精製

これを蒸留水 6 ml に溶解し ODS (オクタデシルシラン) をシリカに結合した逆相系のカラム (内径 2 cm、長さ 25 cm) を用いた HPLC により精製した。溶出は 0.1% トリフルオロ酢酸中、5 から 35% のアセトニトリルの直線濃度勾配により行った。精製物の収量は 29 mg であった。本物質の構造は FAB 質量分析により確認された。測定値 [M+H]⁺; 1204、計算値 (C₄₇H₇₅N₁₄O₂₁P₁+H); 1204。

【0028】

製造例 6 配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有する部分ペプチド(以下、本ペプチドを「PT231」、本ペプチドに対する抗体を「anti-PT231」と称することもある)の調製

H-Cys-Val-Ala-Val-Val-Arg-Thr(H_2PO_3)-Pro-Pro-Lys-Ser-Pro-Ser-Ser-OH で表されるペプチドを次に述べる方法により製造した。なお、以下の説明で用いる記号は各々次のものを示す。Bzl樹脂：ベンジルアルコール樹脂；Boc：t-ブチルオキシカルボニル基；Bzl：ベンジル基；MBzl：4-メトキシベンジル基；Mts：メチレンスルホニル基；cHex：シクロヘキシル基；Z(2-Cl)：2-クロルベンジルオキシカルボニル基。

【0029】

(イ) H-Cys(MBzl)-Val-Ala-Val-Val-Arg(Mts)-Thr [$\text{PO}(\text{OcHex})_2$]-Pro-Pro-Lys[Z(2-Cl)]-Ser(Bzl)-Pro-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Bzl樹脂の製造

Boc-Ser(Bzl)-Bzl樹脂 71 mg (アミン含量 0.70 mmol/g 樹脂) をバイオサーチ社製 9500 型自動ペプチド合成機にセットし、これに Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Lys[Z(2-Cl)]-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Thr [$\text{PO}(\text{OcHex})_2$]-OH, Boc-Arg(Mts)-OH, Boc-Val-OH, Boc-Val-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Val-OH, Boc-Cys(MBzl)-OH を供給し、ジイソプロピルカルボジイミドを縮合剤として順次縮合させて上記の側鎖保護ペプチド-Bzl樹脂 62 mg を得た。

【0030】

(ロ) トリフルオロメタンスルホン酸処理

上記(イ)で得た側鎖保護ペプチド-Bzl樹脂 62 mg にトリフルオロメタンスルホン酸 0.9 ml とチオアニソール 1.2 ml とトリフルオロ酢酸 6.6 ml と m-クレゾール 0.9 ml とエタンジチオール 0.4 ml を加え、氷冷下 5 分、続いて室温で 3 時間反応させた。反応終了後、氷冷したジエチルエーテル 200 ml を加えてペプチドを沈殿させた。全内容物をガラスフィルターで濾取し、冷ジエチルエーテルで洗浄した後 2 M 酢酸 170 ml で抽出処理して H-Cys-Val-Ala-Val-Val-Arg-Thr(H_2PO_3)-Pro-Pro-Lys-Ser-Pro-Ser-Ser-OH で表される粗ペプ

チド 21 mg を得た。

【0031】

(ハ) ペプチドの精製

これを 30% 酢酸 10 ml に溶解してセファデックス G-25 のカラム (内径 5 cm、長さ 107 cm) にかけて、同じ溶媒を用いて溶出して目的物を含む画分を集めた。この精製物の収量は 12 mg であった。

これを 30% 酢酸 5 ml に溶解し ODS (オクタデシルシラン) をシリカに結合した逆相系のカラム (内径 2 cm、長さ 25 cm) を用いた HPLC により精製した。溶出は 0.1% トリフルオロ酢酸中、13% のアセトニトリルにより行った。精製物の収量は 7 mg であった。本物質の構造は FAB 質量分析により確認された。測定値 $[M+H]^+$; 1509、計算値 ($C_{61}H_{107}N_{18}O_{22}P_1S_1 + H$) ; 1508。

【0032】

製造例 7 配列表の配列番号 11 に記載のアミノ酸配列を有する部分ペプチド (以下、本ペプチドを「PS396」、本ペプチドに対する抗体を「anti-PS396」と称することもある) の調製

H-Cys-Glu-Ile-Val-Tyr-Lys-Ser(H_2PO_3)-Pro-Val-Val-Ser-Gly-NH₂ で表されるペプチドを次に述べる方法により製造した。なお、以下の説明で用いる記号は各々次のものを示す。MBHA樹脂: p-メチルベンツヒドリルアミン樹脂; Boc: t-ブチルオキシカルボニル基; Bzl: ベンジル基; MBzl: 4-メトキシベンジル基; cHex: シクロヘキシル基; Z(2-Br): 2-ブロモベンジルオキシカルボニル基; Z(2-Cl): 2-クロルベンジルオキシカルボニル基。

【0033】

(イ) H-Cys(MBzl)-Glu(OBzl)-Ile-Val-Tyr[Z(2-Br)]-Lys[Z(2-Cl)]-Ser[P(O)(cHex)₂]-Pro-Val-Val-Ser(Bzl)-Gly-MBHA樹脂の製造

MBHA樹脂 131 mg (アミン含量 0.76 mmol/g 樹脂) をバイオサーチ社製 9500 型自動ペプチド合成機にセットし、これに Boc-Gly-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Val-OH, Boc-Val-OH, Boc-Pro-OH, Ser[P(O)(cHex)₂]-OH, Boc-Lys[Z(2-Cl)]-OH, Tyr[Z(2-Br)]-OH, Boc-Val-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Glu(OBzl)-OH,

Boc-Cys(MBzl)-OHを供給し、ジイソプロピルカルボジミドを縮合剤として順次縮合させて上記の側鎖保護ペプチド-MBHA樹脂 376 mg を得た。

【0034】

(ロ) トリフルオロメタンスルホン酸処理

上記(イ)で得た側鎖保護ペプチド-MBHA樹脂中の188 mgを採取し、これに1 M濃度のメタンスルホン酸とチオアニソールを含むトリフルオロ酢酸 10 ml と *m*-クレゾール 0.05 ml を加え、氷冷下4時間反応させた。反応終了後、氷冷したジエチルエーテル 200 ml を加えてペプチドを沈殿させた。全内容物をガラスフィルターで濾取し、冷ジエチルエーテルで洗浄した後2 M酢酸 200 ml で抽出処理してH-Cys-Glu-Ile-Val-Tyr-Lys-Ser(H₂PO₃)-Pro-Val-Val-Ser-Gly-NH₂で表される粗ペプチド 87 mg を得た。

【0035】

(ハ) ペプチドの精製

これを30%酢酸 9 ml に溶解しODS (オクタデシルシラン) をシリカに結合した逆相系のカラム (内径 2 cm、長さ 25 cm) を用いたHPLCにより精製した。溶出は0.1%トリフルオロ酢酸中、16%のアセトニトリルにより行った。精製物の収量は45 mgであった。本物質の構造はFAB質量分析により確認された。測定値 $[M+H]^+$; 1360、計算値 (C₅₇H₉₅N₁₄O₂₀P₁S₁ + H); 1360。

【0036】

製造例 8~10

配列表の配列番号4、12及び14に記載のアミノ酸配列を有する部分ペプチドについても上記製造例5、6および7と同様にして得た(以下、これらのペプチドをそれぞれ「PT205」、「PS404」、「PS422」、これらのペプチドに対する抗体をそれぞれ「anti-PT205」、「anti-PS404」、「anti-PS422」と称することもある)。

【0037】

製造例 11 配列表の配列番号7に記載のアミノ酸配列を有する部分ペプチド (以下、本ペプチドを「PS235」、本ペプチドに対する抗体を「anti-PS235」と称

することもある)の調製

H-Cys-Arg-Thr-Pro-Pro-Lys-Ser(H_2PO_3)-Pro-Ser-Ser-Ala-Lys-OH で表されるペプチドを次に述べる方法により製造した。なお、以下の説明で用いる記号は各々次のものを示す。Alko樹脂：p-アルコキシベンジルアルコール樹脂；Boc：t-ブチルオキシカルボニル基；tBu：t-ブチル基；Bzl：ベンジル基；Fmoc：9-フルオレニルメトキシカルボニル基；Trt：トリチル基；Pmc：ペンタメチルクロマン-6-スルホニル基。

【0038】

(イ) H-Cys(Trt)-Arg(Pmc)-Thr(tBu)-Pro-Pro-Lys(Boc)-Ser[PO(OH)(OBzl)]-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ala-Lys(Boc)-Alko樹脂の製造

Fmoc-Lys(Boc)-Alko樹脂 385 mg (アミノ酸含量 0.65 mmol/g 樹脂) をアプライドバイオシステムズ社製 431A 型自動ペプチド合成機にセットし、これに Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser[PO(OH)(OBzl)]-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH を供給し、HBTU [2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate] を縮合剤として順次縮合させて側鎖保護ペプチド-Alko樹脂中間体 716 mg を得た。この中間体 358 mg に Fmoc-Cys(Trt)-OH を縮合し上記の側鎖保護ペプチド-Alko樹脂 395 mg を得た。

【0039】

(ロ) トリフルオロ酢酸処理

上記(イ)で得た側鎖保護ペプチド-Alko樹脂中の 196 mg を採取し、これにトリフルオロ酢酸 8.25 ml、精製水 0.5 ml、チオアニソール 0.5 ml、フェノール 0.75 ml、エタンジチオール 0.25 ml よりなる混合液を加え、室温で 1.5 時間反応させた。反応終了後、氷冷したジエチルエーテル 200 ml を加えてペプチドを沈殿させた。全内容物をグラスフィルターで濾取し、冷ジエチルエーテルで洗浄した後 2M 酢酸 80 ml で抽出処理して H-Cys-Arg-Thr-Pro-Pro-Lys-Ser(H_2PO_3)-Pro-Ser-Ser-Ala-Lys-OH で表される粗ペプチド 82 mg を得た。

【0040】

(ハ) ペプチドの精製

これを0.1%トリフルオロ酢酸7mlに溶解しODS（オクタデシルシラン）をシリカに結合した逆相系のカラム（内径2cm、長さ25cm）を用いたHPLCにより精製した。溶出は0.1%トリフルオロ酢酸中、7%のアセトニトリルにより行った。精製物の収量は62mgであった。本物質の構造はFAB質量分析により確認された。測定値 $[M+H]^+$; 1339、計算値 $(C_{52}H_{92}N_{17}O_{20}P_1S_1+H)$; 1339。

【0041】

製造例12～15

配列表の配列番号5、8、9及び10に記載のアミノ酸配列を有する部分ペプチドについても上記製造例11と同様にして得た（以下、これらのペプチドをそれぞれ「PS199,202」、「ratPS235」、「PT231,PS235」、「PS262」、これらのペプチドに対する抗体をそれぞれ「anti-PS199,202」、「anti-ratPS235」、「anti-PT231,PS235」、「anti-PS262」と称することもある）。

【0042】

製造例16 配列表の配列番号17に記載のアミノ酸配列を有する部分ペプチド（以下、本ペプチドを「Tau-C」、本ペプチドに対する抗体を「anti-Tau-C」と称することもある）の調製

H-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Asp-Glu-Val-Ser-Ala-Ser-Leu-Ala-Lys-OHで表されるアミノ酸配列をもつペプチドを次に述べる方法により製造した。なお、以下の説明で用いる記号は各々次のものを示す。Alko樹脂：p-アルコキシベンジルアルコール樹脂；Boc：t-ブチルオキシカルボニル基；tBu：t-ブチル基；Bzl：ベンジル基；Fmoc：9-フルオレニルメトキシカルボニル基；Trt：トリチル基。

【0043】

(イ) H-Ser(tBu)-Pro-Gln(Trt)-Leu-Ala-Thr(tBu)-Leu-Ala-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Val-Ser(tBu)-Ala-Ser-Leu-Ala-Lys(Boc)-Alko樹脂の製造

Alko樹脂284mg（アミン含量0.88mmol/g樹脂）をABI社製A4

31型自動ペプチド合成機にセットし、これにFmoc-Lys(Boc)-OHをジメチルアミノピリジンとジイソプロピルカルボジイミドを縮合剤として結合し、これにFmoc-Ala-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OHを供給し、HBTU [2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyluronium hexafluorophosphate] を縮合剤として順次縮合させて上記の側鎖保護ペプチド-Alko樹脂905mgを得た。

【0044】

(ロ) トリフルオロ酢酸処理

上記(イ)で得た側鎖保護ペプチド-Alko樹脂中の543mgを採取し、これにトリフルオロ酢酸9.5mlとエタンジチオール0.25mlと蒸留水0.5mlを加え、氷冷下5分、続いて室温で1.5時間反応させた。反応終了後、氷冷したジエチルエーテル200mlを加えてペプチドを沈殿させた。全内容物をガラスフィルターで濾取し、冷ジエチルエーテルで洗浄した後2M酢酸100mlで抽出してH-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Asp-Glu-Val-Ser-Ala-Ser-Leu-Ala-Lys-OHで表される粗ペプチド250mgを得た。

【0045】

(ハ) ペプチドの精製

これを30%酢酸20mlに溶解してセファデックスG-25のカラム(内径5cm、長さ107cm)にかけ、同じ溶媒を用いて溶出して目的物を含む画分を集めた。この精製物の収量は122mgであった。本物質の構造はFAB質量分析により確認された。測定値 $[M+H]^+$; 1702、計算値 $(C_{73}H_{125}N_{19}O_{27}S_2+H)$; 1701。

【0046】

製造例17 配列表の配列番号18に記載のアミノ酸配列を有する部分ペプチド(以下、本ペプチドを「Tau-N」、本ペプチドに対する抗体を「anti-Tau-N」と称することもある)の調製

H-Ala-Glu-Pro-Arg-Gln-Glu-Glu-Phe-Glu-Val-Met-Glu-Cys-NH₂ で表されるア

ミノ酸配列をもつペプチドを次に述べる方法により製造した。なお、以下の説明で用いる記号は各々次のものを示す。Fmoc-NH-SAL樹脂：4-(2',4'-dimethoxyphenyl-Fmoc-aminoethyl)-phenoxy樹脂；Boc：t-ブチルオキシカルボニル基；tBu：t-ブチル基；Bzl：ベンジル基；Fmoc：9-フルオレニルメトキシカルボニル基；Trt：トリチル基；Pmc：ペンタメチルクロマン-6-スルホニル基。

【0047】

(イ) H-Ala-Glu(OtBu)-Pro-Arg(Pmc)-Gln(Trt)-Glu(OtBu)-Phe-Glu(OtBu)-Val-Met-Glu(OtBu)-Cys(Trt)-NH-SAL樹脂の製造

Fmoc-NH-SAL樹脂 532 mg (アミン含量 0.47 mmol/g 樹脂) を ABI 社製 A431 型自動ペプチド合成機にセットし、これに Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH を供給し、HBTU [2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyluronium hexafluorophosphate] を縮合剤として順次縮合させて上記の側鎖保護ペプチド-NH-SAL樹脂 1122 mg を得た。

【0048】

(ロ) トリフルオロ酢酸処理

上記(イ)で得た側鎖保護ペプチド-NH-SAL樹脂中の 673 mg を採取し、これにフェノール 0.75 ml とチオアニソール 0.5 ml とトリフルオロ酢酸 8.25 ml とエタンジチオール 0.25 ml と蒸留水 0.5 ml を加え、氷冷下 5 分、続いて室温で 1.5 時間反応させた。反応終了後、氷冷したジエチルエーテル 200 ml を加えてペプチドを沈殿させた。全内容物をガラスフィルターで濾取し、冷ジエチルエーテルで洗浄した後 2M 酢酸 50 ml と蒸留水 250 ml で抽出処理して H-Ala-Glu-Pro-Arg-Gln-Glu-Glu-Phe-Glu-Val-Met-Glu-Cys-NH₂ で表される粗ペプチド 182 mg を得た。

【0049】

(ハ) ペプチドの精製

これを 30% 酢酸 20 ml に溶解してセファデックス G-25 のカラム (内径 5 cm、長さ 107 cm) にかけて、同じ溶媒を用いて溶出して目的物を含む画分

を集めた。この精製物の収量は136mgであった。

これを20%アセトニトリル20mlに溶解しODS（オクタデシルシラン）をシリカに結合した逆相系のカラム（内径2cm、長さ25cm）を用いたHPLCにより精製した。溶出は0.1%トリフルオロ酢酸中、22%のアセトニトリルにより行った。精製物の収量は96mgであった。本物質の構造はFAB質量分析により確認された。測定値 $[M+H]^+$; 1467、計算値 $(C_{61}H_{95}N_{17}O_{21}S_2+H)$; 1467。

【0050】

製造例18 抗体の調製

上記製造例1～17で得られた部分ペプチドをキーホール・リンペットのヘモシアニンに結合させた後、ウサギに免疫した。得られた抗血清をImmunopure gentle Ag/Ab buffer system(Pierce社製)を使用し、それぞれの抗原ペプチドを結合させたAffigel 15 (Bio-Rad社製)カラムから溶出させることにより精製して、上記で示したリン酸化部位を特異的に認識する抗体が得られる。

【0051】

抗体の特異性は、ドットブロットで確認した。

即ち、immobilon P-membrane (Millipore社製)に70%DMSO溶液の各種ペプチドを18pmolずつ点(ドット)になるように並べて吸着させ乾燥させた。このmembraneを5%スキムミルク入りのTBS(20mM Tris-HCl(pH 7.5), 150mM NaCl)に1時間浸して、以後の操作で加える抗体が非特異的にmembraneに結合することを防ぐ。その後TBSで5分間3回洗い、目的の抗体(一次抗体)を加えたTBSに浸しパラフィルムに挟み湿箱中で4℃14時間反応させ、membrane上の抗原蛋白質に一次抗体を結合させる。0.05% Tween 20入りのTBS(TBST)でmembraneを5分間3回洗う。以下、発色までの操作はProtoBlot Western Blot AP System (Promega社製)を用いる。アルカリホスファターゼの共有結合した抗ウサギIgG抗体(二次抗体)をTBSTに5000倍希釈し、その希釈液にmembraneを4℃で2時間浸すことでmembrane上の抗原-一次抗体結合物に二次抗体を介してアルカリホスファターゼを結合させる。TBSTでmembraneを5分間3回、TBSで5分間2回洗い、

その後membrane上のアルカリホスファターゼの存在を、発色剤 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) とnitro blue tetrazolium (NBT) をそれぞれ0.165mg/mlと0.33mg/mlの濃度で含む反応液(100mM Tris-HCl (pH9.5), 100mM NaCl, 5mM MgCl₂)にmembraneを浸し紫色に発色させることで検出する。membraneを水に浸すことで反応を停止する。

【0052】

この実施例で用いた一次抗体はすべてウサギの抗血清のままであるが、抗血清からペプチドカラムによってアフィニティ精製したIgGでも同様な結果が得られることが確認されている。抗血清の希釈率は、anti-PS199が1000倍、anti-PS202が250倍、anti-PT205が500倍、anti-PT231が250倍、anti-PS235が25倍、anti-rat PS235(anti-rPS235)が25倍、anti-PS262が500倍、anti-PS396が1000倍、anti-PS404が500倍、anti-PS413が500倍、anti-PS422が500倍である。なお、コントロールとして配列番号19のアミノ酸配列で表されるペプチド(図1中、K1で示す、配列番号1の226番目から240番目のアミノ酸配列で表されるペプチド)、配列番号20のアミノ酸配列で表されるペプチド(図1中、K2で示す、配列番号1の191番目から224番目のアミノ酸配列で表されるペプチド)、配列番号21のアミノ酸配列で表されるペプチド(図1中、AK-K3で示す、配列番号1の384番目から438番目のアミノ酸配列で表されるペプチド)および配列番号22のアミノ酸配列で表されるペプチド(図1中、S262で示す、配列番号1の257番目から267番目のアミノ酸配列で表されるペプチドのN末端にシステインを付加させたもの)の非リン酸化ペプチドを使用した。これらのペプチドは、上記製造例1の(イ)～(ロ)と同様にして製造した。

【0053】

図1にドットプロットの結果を示す。横軸にドットでメンブレンに吸着させたペプチド、縦軸に抗体を示す。上記で得られた抗体がそれぞれのリン酸化部位に対して特異的に結合していることがわかる。

実施例1 抗体を用いたアルツハイマー病の診断

(1) ヒト脳抽出液の調製

正常ヒト脳8例とアルツハイマー病患者脳19例を用いて行った。また、以下の操作はすべて4℃で行った。

【0054】

死後のヒト大脳皮質の凍結標品から1gを取り出し、TSinh溶液[50mM Tris-HCl (pH7.6)、0.15M NaCl、0.5mM DIFP、1μg/ml アンチパイン、0.5mM PMSF、1mg/ml TLCK、1μg/ml ロイペプチン、0.1μg/ml ペプスタチン]3ml中で剃刀で細かく刻み、超音波破碎し、さらにホモジナイザーにより懸濁液にした。80,000rpmで15分の遠心分離を行い、上清を得た。この上清中のヒトIgGをProtein G-Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia社製)により除去して得た画分をTS画分とした。沈殿を前述のTSinh 2ml中で超音波破碎とホモジナイザーにより懸濁液にし80,000rpm、15分の遠心分離を行うことで洗浄し、その後この沈殿を1%Triton X-100、TSinh 2ml中で超音波破碎とホモジナイザーにより懸濁液にした。この懸濁液に対し、80,000rpm、15分の遠心分離を行い、上清(TX画分)を得た。沈殿を1%Triton X-100、TSinh 2ml中で超音波破碎とホモジナイザーにより懸濁液にし、80,000rpm、15分の遠心分離を行うことで洗浄し、その後2%SDS、TSinh 2ml中で超音波破碎とホモジナイザーにより懸濁液にした。80,000rpm、15分の遠心分離を行い上清(SDS上清画分)を得た。沈殿を2%SDS、TSinh 2ml中で超音波破碎とホモジナイザーにより懸濁液にし、80,000rpm、15分の遠心分離を行うことで洗浄し、その後この沈殿を2%SDS、TSinh 2ml中で超音波破碎とホモジナイザーにより懸濁液(SDS沈殿画分)にした。

【0055】

(2) リン酸化部位特異抗体による免疫ブロット

上記で得られた各画分にLaemmliのサンプル処理液(Nature, 227, 680-685(1970))を加え、95℃で5分間加熱し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動し、immobilon P-membrane (Millipore社製)に転写した。5%スキムミルク、T

B Sで2時間ブロッキングした後、上記製造例18で得られたリン酸化部位特異抗体を一次抗体として14時間反応させた。Tween 20、TBSで洗った後、Promega社のProtoBlot APにより二次抗体処理してメンブレン上の抗原抗体反応物を発色させた。

【0056】

一次抗体はすべてウサギのIgGで、一次抗体の希釈率は実施例の図2～図4中の各抗体の名称の下にxの次の数字で示した。ほとんどの一次抗体は抗原ペプチドカラムによってアフィニティ精製してあるが、PS262とPS422は抗血清のままであり、図中のこれらの抗体名称の下にSを付して区別した。

Tau-NおよびTau-Cはそれぞれ製造例16および製造例17で得られたペプチドで、配列表の配列番号1で表されるヒトタウ蛋白質中、Tau-Nは2番目から12番目のアミノ酸配列に対応し、Tau-Cは422番目から438番目のアミノ酸配列に対応し、それぞれタウ蛋白質の存在を示すコントロールとして使用した。

【0057】

なお、ポジティブコントロールとして生後8日目の幼若ラット全脳抽出液を使用した。幼若タウ蛋白質は高度にリン酸化されたPHF中のタウ蛋白質として知られている(J. Biol. Chem., 268, 25712-25717(1993))。生後8日目の幼若ラット脳0.75gを、10mM Tris-HCl (pH 7.4)、50mM NaCl、50mM NaF、1mM EDTA、1mM EGTA、50mM β -グリセロリン酸、10-4M Na_3VO_4 、1mM PMSF、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンチパイン、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ロイペプチン、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペプスタチン、3mM ベンズアミジンを含む培地1.5ml中でホモジナイズし、25,000rpmで20分遠心分離を行った後の上清をポジティブコントロールとして使用した。

【0058】

結果を図2、図3及び図4に示す。図2はTS画分の免疫ブロット結果を示し、図3及び図4はSDS沈殿画分の免疫ブロット結果を示す。図中、AD/Nの欄のAはアルツハイマー病患者脳抽出液の結果を、Nは正常脳抽出液の結果を示し、Mのレーンは分子量マーカーを、その隣の数字はマーカーの分子量をkDの単位で示す。rat P8のレーンはポジティブコントロールの免疫ブロット結果を示

し、矢印で示したバンドがリン酸化タウ蛋白質のバンドを示す。

【0059】

いずれの抗体も正常脳抽出液では反応せず、アルツハイマー病患者脳抽出液では反応しており、本発明の方法によりアルツハイマー病の診断が可能であることがわかる。また、T S画分は易溶性のタウ蛋白質を、S D S沈殿画分は難溶性のタウ蛋白質を含むため、本発明の方法によれば、組織中のリン酸化タウ蛋白質の存在だけでなく、易溶性タウ蛋白質を含むと思われる脳脊髄液または血中のリン酸化タウ蛋白質の存在も認識可能であり、試料として組織だけでなく脳脊髄液または血液も使用可能であることがわかる。

【0060】

【発明の効果】

本発明によれば、P H F中のリン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位を含む部分ペプチドを免疫して得られる抗体を用いてアルツハイマー病の診断を行うことができる。

【0061】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：441

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly Gln Asp

1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Glu

20 25 30 35

Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu Gln Thr Pro Thr Glu Asp

40 45 50

Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala

特平 8-056090

55	60	65	70
Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala			
75	80	85	90
Ala Gln Pro His Thr Glu Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile			
95	100	105	
Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg			
110	115	120	125
Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly			
130	135	140	
Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln			
145	150	155	160
Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys			
165	170	175	180
Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser			
185	190	195	
Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro			
200	205	210	215
Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys			
220	225	230	
Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp			
235	240	245	250
Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro			
255	260	265	270
Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln			
275	280	285	
Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val			
290	295	300	305
Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser			
310	315	320	

Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu
 325 330 335 340
 Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
 345 350 355 360
 Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe
 365 370 375
 Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser
 380 385 390 395
 Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr
 400 405 410
 Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
 415 420 425 430
 Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 435 440

【0062】

配列番号：2

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

他の情報：配列中Xaaはphosphoserineを表す

配列

Lys Ser Gly Tyr Ser Xaa Pro Gly Ser Pro Gly Thr
 1 5 10

【0063】

配列番号：3

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

他の情報：配列中Xaaはphosphoserineを表す

配列

Lys Ser Ser Pro Gly Xaa Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg

1 5 10

【0064】

配列番号：4

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

他の情報：配列中Xaaはphosphoserineを表す

配列

Cys Pro Gly Ser Pro Gly Xaa Pro Gly Ser Arg Ser

1 5 10

【0065】

配列番号：5

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

他の情報：配列中Xaaはphosphoserineを表す

配列

Lys Ser Xaa Pro Gly Xaa Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg

1 5 10

【0066】

配列番号：6

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

他の情報：配列中Xaaはphosphoserineを表す

配列

Cys Val Ala Val Val Arg Xaa Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser

1 5 10

【0067】

配列番号：7

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

他の情報：配列中Xaaはphosphoserineを表す

配列

Cys Arg Thr Pro Pro Lys Xaa Pro Ser Ser Ala Lys

1 5 10

【0068】

配列番号：8

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

他の情報：配列中Xaaはphosphoserineを表す

配列

Cys Arg Thr Pro Pro Lys Xaa Pro Ser Ala Ser Lys

1 5 10

【0069】

配列番号：9

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

他の情報：配列中Xaaはphosphoserineを表す

配列

Cys Arg Xaa Pro Pro Lys Xaa Pro Ser Ser Ala Lys

1 5 10

【0070】

配列番号：10

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

他の情報：配列中Xaaはphosphoserineを表す

配列

Cys Lys Ser Lys Ile Gly Xaa Thr Glu Asn Leu Lys

1 5 10

【0071】

配列番号：11

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

他の情報：配列中Xaaはphosphoserineを表す

配列

Cys Glu Ile Val Tyr Lys Xaa Pro Val Val Ser Gly

1 5 10

【0072】

配列番号：12

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

他の情報：配列中Xaaはphosphoserineを表す

配列

Cys Val Ser Gly Asp Thr Xaa Pro Arg His Leu Ser

1 5 10

【0073】

配列番号：13

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

他の情報：配列中Xaaはphosphoserineを表す

配列

Lys Leu Ser Asn Val Ser Xaa Thr Gly Ser Ile Asp

1 5 10

【0074】

配列番号：14

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

他の情報：配列中Xaaはphosphoserineを表す

配列

Cys Ile Asp Met Val Asp Xaa Pro Gln Leu Ala Thr

1 5 10

【0075】

配列番号：15

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

他の情報：配列中Xaaはphosphoserineを表す

配列

Lys Leu Ser Asn Val Xaa Ser Thr Gly Ser Ile Asp

1 5 10

【0076】

配列番号：16

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

他の情報：配列中Xaaはphosphoserineを表す

配列

Lys Leu Ser Asn Val Xaa Xaa Thr Gly Ser Ile Asp

1 5 10

【0077】

配列番号：17

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys

1 5 10 15

【0078】

配列番号：18

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Cys

1 5 10

配列番号：19

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys

1 5 10 15

【0079】

配列番号：20

配列の長さ：34

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser

1 5 10 15

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys

20 25 30

【0080】

配列番号：21

配列の長さ：55

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly

1 5 10 15

Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met

20 25 30 35

Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala

40 45 50

Lys

55

【0081】

配列番号：22

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Cys Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys

1 5 10

【図面の簡単な説明】

【図1】

リン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位を含む部分ペプチドを免疫して得られた抗体の特異性を示すドットプロットの図である。

【図2】

実施例で得られたTS画分と本発明で用いる抗体との反応性を示す電気泳動の図（免疫プロット）である。

【図3】

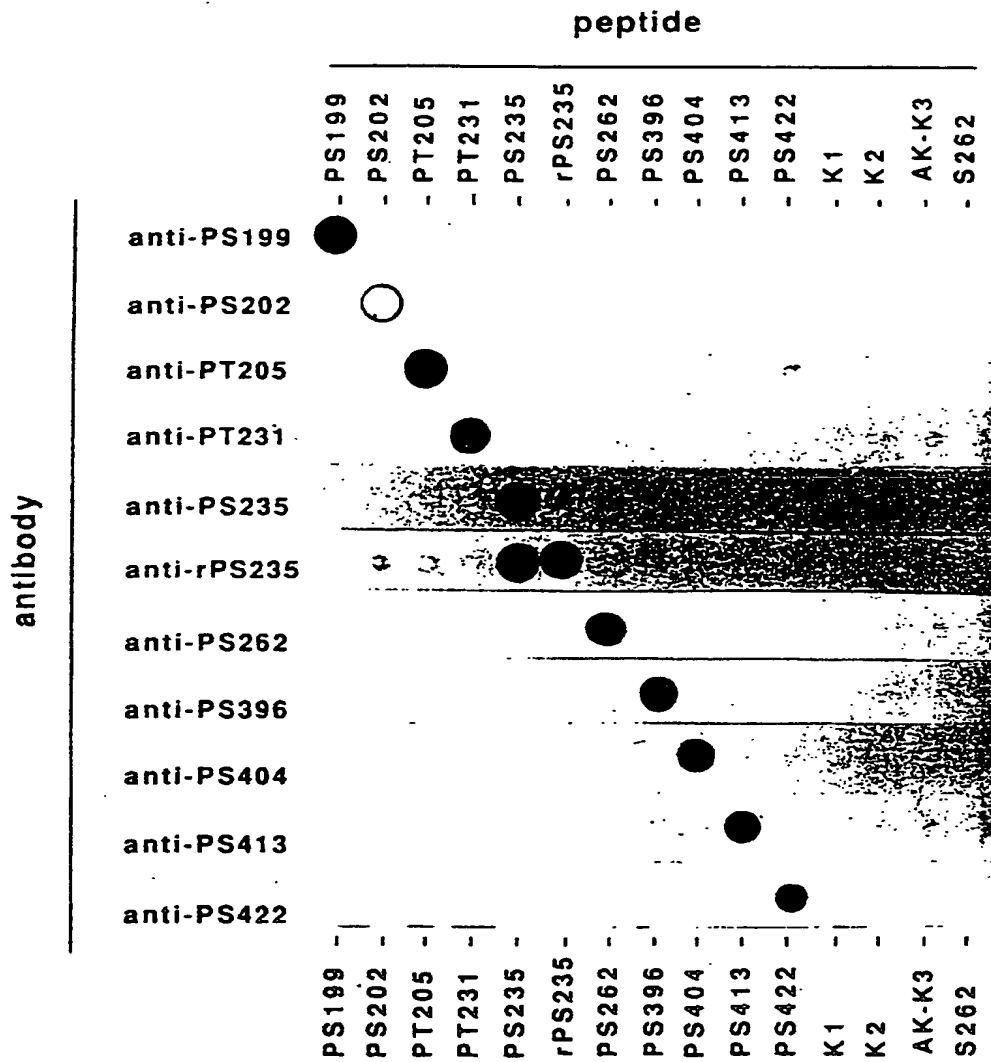
実施例で得られたSDS沈殿画分と本発明で用いる抗体との反応性を示す電気泳動の図（免疫プロット）である。

【図4】

実施例で得られたSDS沈殿画分と本発明で用いる抗体との反応性を示す電気泳動の図（免疫プロット）である。

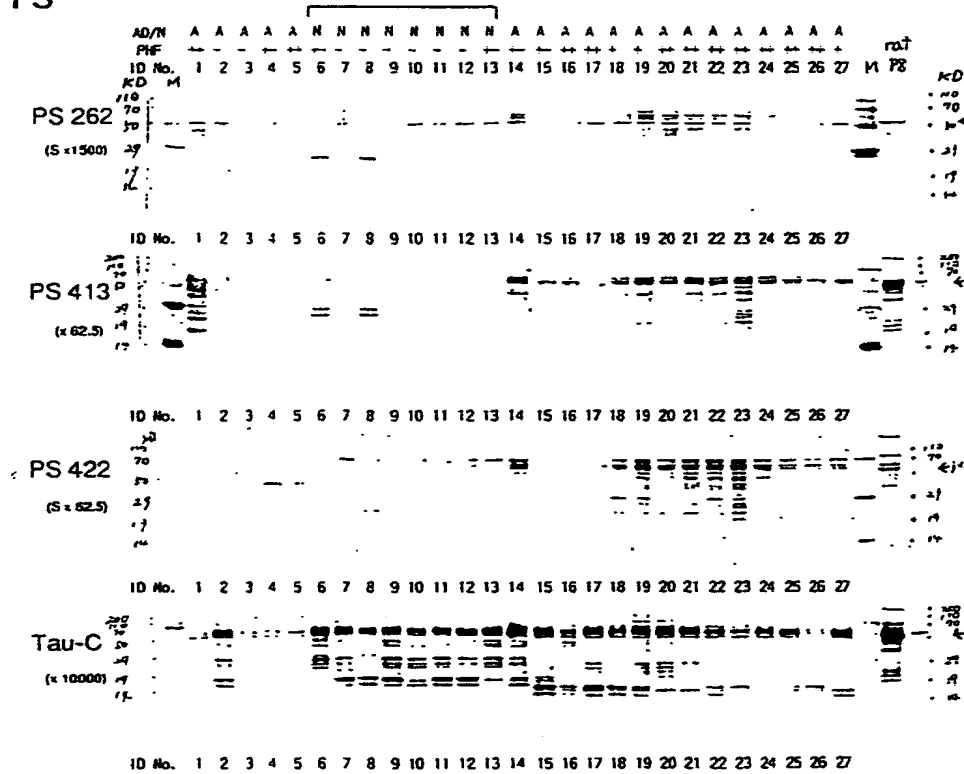
【書類名】 図面

【図 1】



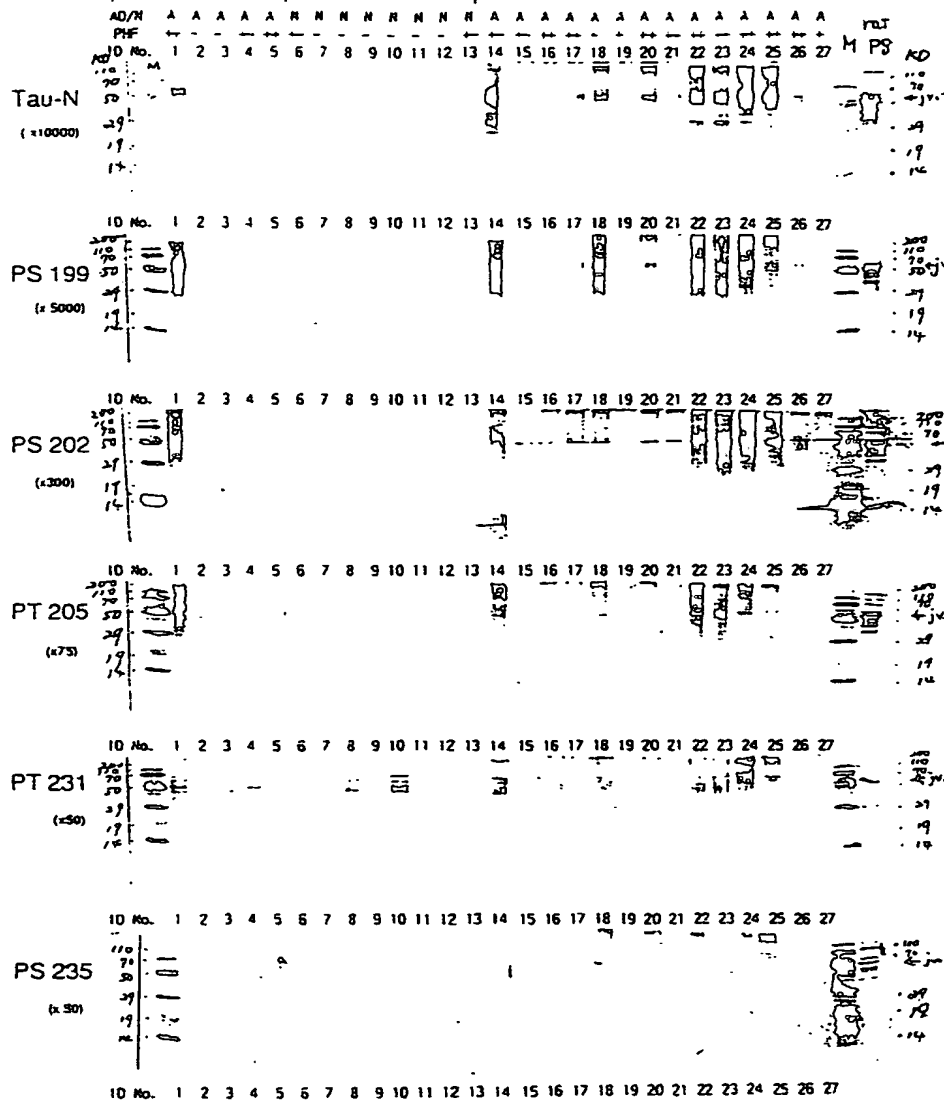
【図2】

TS



【図3】

SDSppt



SDSppt



【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 臨床上有効なアルツハイマー病の診断方法の提供。

【構成】 ペアード・ヘリカル・フィラメント (Paired Helical Filament) 中のリン酸化タウ蛋白質のリン酸化部位を含む部分ペプチドを免疫して得られる抗体を用いてアルツハイマー病を診断する方法。

【選択図】 なし

特平 8-056090

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 000005968
【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
【氏名又は名称】 三菱化学株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100103997
【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号 三菱化学株式会社内
【氏名又は名称】 長谷川 暁司

特平 8-056090

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005968]

1. 変更年月日	1994年10月20日
[変更理由]	名称変更
住 所	東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
氏 名	三菱化学株式会社

